

УДК 612.111.11: 612.23

УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В ФОРМИРОВАНИИ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА

© 2003 г. В. В. Зинчук

Медицинский университет, Гродно, Беларусь

Анализ литературы и результаты выполненных нами исследований свидетельствуют о том, что *L*-аргинин-оксид азота (NO)-система может участвовать в формировании кислородтранспортной функции крови. NO в реакции с гемоглобином образует метгемоглобин, нитрозилгемоглобин ($HbFe^{2+}NO$) и *S*-нитрозогемоглобина (*SNO-Hb*). Биологическая функция NO-производных гемоглобина достаточно широка (транспорт NO, его депонирование, элиминация и другие), они участвуют в генезе многих патологических состояний. Присутствие различных соединений гемоглобина с NO может по-разному влиять на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) всей крови. Метгемоглобин и *SNO-Hb* его повышают, а $HbFe^{2+}NO$ снижает, соответственно. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови может иметь важное значение для процессов газообмена. На уровне капилляров малого круга кровообращения это может быть дополнительным механизмом, способствующим оксигенации крови, а на уровне микроциркуляции большого круга – оптимизирующим десатурацию крови и соответственно доставку кислорода в ткани. Кислородсвязывающие свойства крови влияют на состояние *L*-аргинин-NO-системы. В то же время данная система может определять СГК через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислородзависимый характер образования NO, регуляцию сосудистого тонуса, действие пероксинитрита.

ВВЕДЕНИЕ

В 1962 г. Perutz M. получил Нобелевскую премию за исследования структурно-функциональной организации гемоглобина, через 26 лет в 1998 г. группа ученых из США (Furchgott R.F., Ignarro L.G., Murad F.) была удостоена этой премии за изучение сосудистых эффектов монооксида азота (NO). Два этих события привели к постановке новой проблемы, а именно взаимодействия гемоглобина с NO, конкретные механизмы его реализации и физиологическое значение. Хотя гемоглобин как белок наиболее изучен, а NO является известной простейшей молекулой, они продолжают нас удивлять непредвиденными сложностями своих эффектов, особенно при совместном действии [38].

L-АРГИНИН-NO СИСТЕМА

В настоящее время активно исследуются различные аспекты биологического действия оксида азота (NO), уникальной молекулы, выполняющей роль физиологического мессенджера, а в некоторых условиях цитотоксической эффекторной молекулы. Ее образование происходит из аминокислоты *L*-аргинина под контролем фермента NO-синтазы в присутствии NADPH, кальмодулина и других кофакторов, образующих в совокупности *L*-аргинин-NO-систему. Регуляция активности NO-синтазы идет по конечному продукту через обратную связь, NO способен связываться с гемической группой фермента, снижая тем самым его

активность [21]. В литературе вышло много обзоров, посвященных *L*-аргинин-NO системе (или *L*-arginine-NO pathway в зарубежной литературе).

Стационарная концентрация NO определяется скоростью его образования и разложения, так как NO и его метаболиты в существенных количествах в тканях не запасаются. Активность различных изоформ NO-синтаз колеблется в широком пределе: тип I (нейрональная) NO-синтаза имеет максимальное значение около 300, тип II (макрофагальная) – до 1000, тип III (эндотелиальная) – около 15 нмоль/мг/мин [11]. Измерение содержания NO в просвете сосудов на различных участках сердечно-сосудистой системы показывает диапазон его изменений в пределах 0.3–1.3 мкмоль [77]. По измерениям с помощью микроэлектродной техники установлено, что эндотелий может вырабатывать в 10–40 раз больше NO, чем это требуется для активации растворимой гемсодержащей гуанилатциклазы [59]. В печени мышей NO продуцируется со скоростью 2 мкмоль/час/г, а в других тканях в 5–10 раз меньше [3]. В ткани миокарда его содержание за счет синтеза эндотелиальной NO-синтазы составляет 100–300 пмоль [51]. Общее количество синтезируемого NO судя по уровню NO_3^- , колеблется от 150 до 1000 мкмоль/сут [75]. Образование NO эндотелием *in situ* или в культуре примерно равно 4 пмоль/кг белка · мин, что в перерасчете на общую массу эндотелия 1.5 кг для организма человека составляет 1728 мкмоль/сут [51]. Оценка об-

разования NO в организме (методом вдыхания стабильного изотопа кислорода $^{18}\text{O}_2$) показала, что скорость его образования составляет 0.38 ± 0.06 мкмоль/кг·ч, а общее суточное количество 600–700 мкмоль [69]. Продуктами разложения NO является нестабильный, но специфический NO_2^- и более стабильный и менее специфичный NO_3^- , более 90% первого имеет эндотелиальную природу происхождения в организме человека [52]. Для регулирования уровня NO в клетках различных тканей существуют различные механизмы, как то S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы негемового железа [2]. NO количественно и функционально отличается от O_2 . Для удовлетворения основных метаболических потребностей организма необходимо миллимолярные количества O_2 и наномолярные концентрации NO. В целом дыхательный цикл можно рассматривать как систему “трех газов” ($\text{NO}/\text{O}_2/\text{CO}_2$) [38].

Активно обсуждается вопрос об альтернативных источниках образования NO. Окислительный процесс превращения гемоглобина в метгемоглобин под действием нитрит-ионов может быть сопряжен с синтезом NO [13]. Предложена концепция цикла азота, согласно которой в образовании NO имеет значение не только L-аргинин-NO система, но и нитритредуктазная система, т.е. в этом процессе восстановления важное значение имеет и активность электронно-донорных систем, участвующих в восстановлении гемоглобина [15]. Предполагается наличие собственных механизмов синтеза NO в эритроцитах, судя по накоплению конечных продуктов его метаболизма $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ [31], цитруллина [27]. Обнаружено методом иммуноблоттинга наличие в эритроцитах белков типа NO-синтазы [48]. Kang E.S. et al. [49] показали, что нормальные циркулирующие эритроциты содержат две изоформы NO-синтазы, не обладающих в обычных условиях каталитической активностью, хотя возможно, что незрелые эритроциты (эритробласты, ретикулоциты) могли бы экспрессировать их NO-синтазную активность, утрачивая ее по мере дифференциации. В этом аспекте дискутируется вопрос о значении существования в эритроцитах собственного источника NO (NO-синтазного или нитрит-гемоглобинового). Учитывая сложную природу участия NO в обеспечении различных функций организма, должны существовать эффективные механизмы регуляции его уровня в тех или иных процессах.

NO И ГЕМОГЛОБИН

Молекула гемоглобина состоит из двух α - и двух β -полипептидных цепей, каждая из которых

связана с гемической группой, содержащей порфириновое кольцо и атом Fe^{2+} , способный образовать 1 молекулу O_2 . Глобиновые субъединицы дезоксигемоглобина тесно удерживаются электростатическими связями в плотной T-конформации со сравнительно низким сродством к O_2 . Присоединение O_2 разрывает эти электростатические связи, ведя к релаксированной R-конформации, в которой остальные связывающиеся участки молекулы гемоглобина имеют сродство к O_2 в 500 раз выше, чем в T-конформации. Эти изменения ведут к кооперативности между связывающимися участками так, что присоединение одной молекулы O_2 с дезоксигемоглобином повышает сродство к нему остальных связывающихся участков на этой же молекуле [41]. В организме СГК в значительной степени определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань [70]. Свойство гемоглобина обратимо связывать кислород, является частным случаем общей закономерности взаимодействия протеинов с лигандами. Представляет интерес изучение взаимодействия гемоглобина с NO, так как он имеет гораздо более высокое сродство к гемической группе дезоксигемоглобина, чем O_2 и CO, что позволяет предполагать его конкурентное с кислородом за соответствующие участки на молекулах частично оксигенированного гемоглобина [34].

Взаимодействие NO с гемоглобином в эритроцитах важно для регуляции обеих этих молекул *in vivo*. Существующие свойства эритроцитов не ограничивают взаимодействие гемоглобина с NO в физиологических условиях, не только не разрушая его биоактивность, но и сохраняя ее. На модели кишечника, в которой создавалась окклюзия верхней брыжеечной артерии и оценивалось образование $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и диэтилдиоксикарбоната с железом, показано, что NO, высвобождаемый из эндотелиальных клеток, диффундирует прежде всего не в ткань, а в кровь [55]. При внутриартериальном введении крысам динитрозильных комплексов железа в крови регистрировали сигнал ЭПР парамагнитного моонитрозильного комплекса, локализованного в основном (до 90%) в форменных элементах крови [3]. В плазме в отличие от цельной крови NO превращается в нитрат довольно не эффективно, что указывает на активное участие форменных элементов крови в его метаболизме [80]. Реакция NO с гемической группой гемоглобина может быть частично ограничена гидрофобным компонентом клеточной мембраны, лимитируя процесс его диффузии в эритроцит [58]. NO переносится через клеточную мембрану посредством специального переносчика протеина AE1, или анион-обменник. Проницаемость эритроцитарной мембраны для NO сравнительно невысока, что может иметь значение

для его биодоступности, реакции NO с гемоглобином [79]. Предполагается существование цитоскелетного барьера для диффузии NO, реализуемого через особые межбелковые брешы (поры) в эритроцитарной мембране, состояние некоторых регулируется и соответственно изменяет вход NO [42]. Скорость реакции гемоглобина с NO, находящегося в эритроцитах, в 800 раз меньше, нежели с эквивалентным количеством свободного гемоглобина [58]. В то же время показано, что клеточная мембрана эритроцитов не является существенным барьером для NO и его производных и не лимитирует его взаимодействие с гемоглобином [61]. Мембрана эритроцитов рассматривается как некий специализированный насос для NO [67]. Она имеет два компартмента для гемоглобина и активно регулирует транспорт NO из клетки: один находится внутри, а другой – на мембране. Регулируемый кислородом клеточный механизм сопряжения синтеза и экспорта биоактивности NO, образуемого гемоглобином, действует через мембранный механизм (комплекс AE1-SNO) [67]. Критическими факторами, определяющими скорость захвата NO эритроцитами, является ориентация мембранных молекул и внутриклеточное перераспределение гемоглобина.

Основные реакции, характеризующие взаимодействие NO с гемоглобином, приведены на рис. 1. В артериальной крови NO в реакции с оксигемоглобином образует нитрат и метгемоглобин, а в венозной – нитрозилгемоглобин ($HbFe^{2+}NO$), способный при высоких pO_2 распадаться с высвобождением молекулы NO, которая окисляется в присутствии кислорода до NO_3^- [80]. Гемоглобин взаимодействует с NO через высокоаффинные Fe^{2+} -связывающие участки на геме, его сродство к NO в 8000 раз выше, чем к O_2 . $HbFe^{2+}NO$ имеет шестикоординатную форму гемических групп [53]. Спектр ЭПР $HbFe^{2+}NO$ в растворе является суперпозицией спектров T- и R-конформеров гемоглобина с преимущественным образованием T-формы, которые обусловлены обратимыми переходами от сильного (R) до слабого (T) взаимодействия Fe^{2+} -гем с проксимальным гистидином [12]. Нитрозилгемоглобин характеризуется выраженным эффектом Бора, что может иметь особенно важное значение при ацидозе [82]. Указывается на возможность реагирования $HbFe^{2+}NO$ с O_2^- с образованием аддукта гема с $ONOO^-$ и последующим образованием NO_3^- [33].

Существуют и другие физиологические механизмы связывания циркулирующего в крови NO. Недавно было установлен участок в глобиновой цепи гемоглобина, в котором NO связывается в форме S-нитрозотиола, а именно S-нитрозогемоглобина ($SNO-Hb$). Масс-спектрометрические

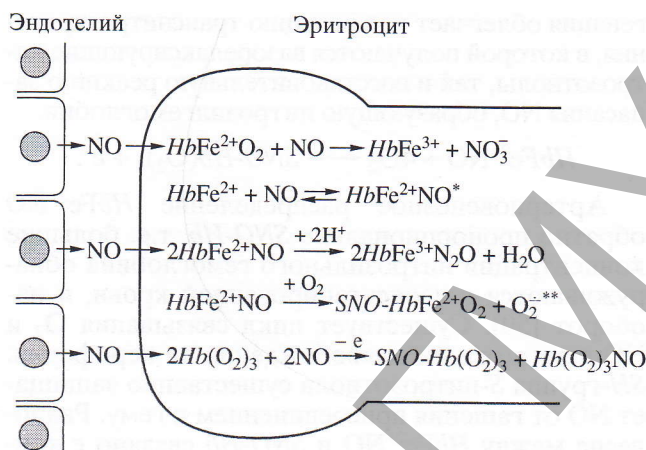


Рис. 1. Взаимодействие NO, образуемого в эндотелии, с внутриэритроцитарным гемоглобином. * – реакция нитрозилования, т.е. присоединение NO к Fe^{2+} в гемической группе; ** – реакция нитрозилования, т.е. присоединение NO по месту SH-группы.

и кристаллографические данные однозначно идентифицировали β^{93} -цистеин как место связывания NO с гемоглобином [62]. При очень больших концентрациях нитрозотиолов *in vitro* образуются и другие формы $SNO-Hb$, у которых нитрозилируется аминокислота цистеин в положении 12 и 104 β - и α -белковых цепей соответственно [60]. NO, образуемый *in vitro* при добавлении индуцибельной изоформы NO-синтазы к эритроцитам, может превращать содержащийся в них гемоглобин в $SNO-Hb$. Кислородсвязывающие свойства $SNO-Hb$ сильно зависят от pH (величина эффекта Бора для него близка к обычному гемоглобину). Протонирование соответствующих аминокислот (β^{146} -гистидина и β^{93} -цистеина) взаимосвязано, что может способствовать высвобождению NO. S-нитрозилирование гемоглобина облегчает отсоединение NO с гема и поступление его к гипоксическим тканям. $SNO-Hb$ выступает в роли акцептора или донора e^- , внося тем самым вклад в редокс-равновесие гема, однако значение этих функций минимально в условиях покоя [34].

Перенос NO от S-нитрозотиола на гемоглобин регулируется аллостерически и функционально связан с присоединением O_2 . По мере связывания гемоглобина с O_2 в легких его сродство для S-нитрозотиола растет, а при отдаче снижается, благодаря чему NO высвобождается в ткани. Существует O_2 -зависимое равновесие между $SNO-Hb$ и $HbFe^{2+}NO$ (при отсутствии низкомолекулярных тиолов вроде цистеина мишенью NO является гем с Fe^{2+} , а в его присутствии следует перенос NO-группы на цистеиновый остаток β -глобина) [62]. Положение редокс-равновесия между $SNO-Hb$ и $HbFe^{2+}NO$ связано с аллостерическим состоянием гемоглобина. После дезоксигенации большая доля $SNO-HbO_2$ превращается в $HbFe^{2+}NO$. Дезокси-

генация облегчает как реакцию транснаитрозиования, в которой получаются вазорелаксирующие нитрозотиолы, так и восстановительную реакцию запасаения NO, образующую нитрозилгемоглобин.



Артериовенозное распределение $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ обратно пропорционально SNO-Hb , т.е. большие концентрации нитрозильного гемоглобина обнаруживаются в деоксигенированной крови, и наоборот [50]. Существует цикл связывания O_2 и NO в легких и их высвобождения на периферии. SH-группа S-нитрозотиола существенно защищает NO от гашения присоединением к гему. Равновесие между $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и SNO-Hb связано с конформацией белка: образование SNO-Hb облегчается в R-структуре, а $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ преимущественно образуется в T-. Высвобождению NO из тиолов способствуют дезоксигенация и окисление гема (T-структура, высокоспиновая); что согласуется с термодинамическими особенностями его связывания [32]. Первичным аддуктом гемоглобина и NO, образуемого при дыхании NO, у нормальных индивидуумов является $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и в небольшом количестве SNO-Hb [36]. SNO-Hb также находится в равновесии с низкомолекулярными нитрозотиолами [62]. Гидроксимочевина реагирует с различными формами гемоглобина, образуя до 6% $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и не образуя SNO-Hb [43].

Глутатион может влиять на равновесие SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, что может влиять на процессы оксигенации и деоксигенации крови в капиллярах малого и большого кругов кровообращения. NO, высвобождаемый из SNO-Hb в присутствии глутатиона, не вызывает заметных сосудистых эффектов в изолированном легком в связи с быстрым окислением NO и образования метгемоглобина [30]. Главным продуктом взаимодействия GSH с SNO-Hb in vivo, вероятно, является $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, за счет чего происходит модификация СГК, сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо.



Анализируя взаимодействие in vivo NO с Hb предполагается следующее соотношение между реакциями, ведущими к образованию NO-производных: метгемоглобин и $\text{NO}_3^+ \gg \text{HbFe}^{2+}\text{NO} > \text{SNO-Hb}$ [34], хотя другие авторы указывают на более высокое содержание $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и SNO-Hb , преобладающее над уровнем метгемоглобина [37]. Связывание NO с оксигемоглобином является кооперативным, его окисление в метгемоглобин при физиологических условиях ограничено и преобладают реакции, ведущие к усиленному образованию $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$. Скорости реакций опосредуемых NO окисление HbO_2 и его связывание с гемом достаточно близки ($3.7 \times 10^7 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и $2.6 \times 10^7 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$, соответственно. Исследование реакции с NO и гемоглоби-

ном, ведущих к образованию метгемоглобина, далеко не всегда доминируют в условиях in vivo. По мнению Gow A.J. et al. [37], взаимодействие NO с HbO_2 не уничтожает его активность, а более того обеспечивает его сохранение (“гемоглобин рационально вводит новую химию, когда его насыщение кислородом высоко, лимитируя окисление NO и сохраняя его биоактивность”).

ЗНАЧЕНИЕ NO-ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМОГЛОБИНА

Биологическая функция NO-производных гемоглобина во многом неясна. Гемоглобин способен выполнять функцию депо NO в микроциркуляторной сети [73]. В сосудистой сети нитрозотиолы, образуемые при опосредуемом NO нитрозировании тиолов, играют важную роль в транспорте, хранении и метаболизме NO [46]. Предполагается, что SNO-Hb действует как “аллостерически контролируемый буфер NO” [68], обменивающий свою NO-группу с тиолами среды, в том числе с глутатионом, и тем самым изменяя кровоток (выполняя роль критического фактора, определяющего доставку O_2). Сравнительно стабильные вазоактивные соединения могут служить системой хранения NO. Депонирование оксида азота можно рассматривать как фактор адаптационной защиты; существует NO-индуцированная активация различных защитных факторов (теплошоковые белки, простагландины, антиоксидантная система) [10]. Например, эндотоксемия резко повышает образование циркулирующих S-нитрозотиолов (через 5 ч после в/б введения крысам ЛПС уровень циркулирующего S-нитрозоальбумина возрастал примерно в 3.4 раза, а SNO-Hb – в 25 по сравнению с контролем) [47]. Сывороточный альбумин может служить ловушкой для низкомолекулярных нитрозотиолов и модулятором переноса NO между сосудистой стенкой и гемоглобином внутри эритроцитов [46].

SNO-Hb может быть “сберегающим” механизмом доставки NO, но лишь в регионах, сопровождающихся значительным стрессом (снижение кровотока, тканевая гипоксия, ацидоз) [34]. Повышенное в гипоксических тканях высвобождение NO из нитрозоформ снижает региональное сосудистое сопротивление [30], что является примером аллостерических свойств гемоглобина, которые улучшают транспорт O_2 путем улучшения соответствия региональных потребностей к O_2 к кровотоку. Нитрозилирование гема и нитрозирование β^{93} -цистеина в белковой цепи гемоглобина играют важную роль в транспорте и метаболизме NO кровью. Образование SNO-Hb не является главным механизмом транспорта NO, но он может способствовать высвобождению NO из гема [34]. Взаимодействие между NO и гемоглобином важно для регуляции функций обоих моле-

кул, однако при нахождении гемоглобина вне эритроцита доминирующим становится гашение NO. Процессы деоксигенации *SNO*-окси-*Hb* в капиллярах обуславливают аллостерический переход гемоглобина (из *R*-состояние в *T*-), что инициирует выход NO [72]. *SNO-Hb* – это вазодилатор, активность которого аллостерически модулируется O_2 . Его оксигенированная структура облегчает сокращение кровеносных сосудов, а дезоксигенированная обеспечивает вазорелаксацию [62]. Ощущая таким образом физиологический градиент кислорода в тканях, гемоглобин использует связанные с конформацией изменения в положении, β^{93} -цистеина для приведения местного кровотока в соответствие с кислородными потребностями [72].

Влияние *SNO-Hb* на транспорт NO к тканям может быть весьма существенным, так как высвобождение NO из комплекса с гемоглобином сильно зависит от наличия или отсутствия кислорода. В гипоксических условиях гемоглобин переходит из *R*- в *T*-конформацию, в которой он не может прочно удерживать данный лиганд [65]. Высвобождение большого количества NO из *Hb*-NO комплексов может приводить к тому, что эти молекулы, конкурируя с супероксиддисмутазой, взаимодействовали бы с супероксидными анион-радикалами, а это в свою очередь обуславливало бы образование пероксинитритов с последующим высвобождением диоксида азота (NO_2) и OH-радикалов, которые вызывают денатурацию белков и повреждают ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран [14, 62]. Как известно, поступление O_2 в ткани определяется его содержанием в крови и величиной кровотока. Эритроциты, секвестрируя NO в терминальных артериолах и капиллярах, уменьшают его участие в вазодилатации и тем самым, казалось бы, противодействуют реализации кислородтранспортной функции крови. Однако кислородзависимый характер равновесия между *HbFe*²⁺NO и *SNO-Hb* обеспечивает соответствие кровотока с его потребностью, т.е. оптимальный баланс между гипоксической вазодилатацией и гипероксической вазоконстрикцией [72]. Существуют механизмы, ускоряющие высвобождение NO из *HbFe*²⁺NO при низких pO_2 за счет перехода гемоглобина в *T*-состояние, для которого константа скорости диссоциации на 2 порядка выше, и еще более усиливаемые гетеротропными факторами (H^+ , 2,3-дифосфоглицерат) [29].

Предполагается возможным путем вдыхания NO при дисфункции эндотелия поддержание нормальной функции сосудов за счет образования различных форм NO-производных гемоглобина и высвобождения ими NO в различных регионах [25].

В гемолизатах эритроцитов крыс с индуцированным стрептозотоцином диабетом был найден

значимо больший уровень *SNO-Hb*, чем у контрольных крыс, что позволяет предполагать об участии гликозилированного гемоглобина в процессах *S*-нитрозилирования, которое в свою очередь может нарушать функцию сосудов и участвовать в диабетической микроангиопатии [64]. Обратимая секвестрация NO гемоглобином (через *HbFe*²⁺NO) играет важную роль в развитии ряда заболеваний почек [50]. При трансплантации печени обнаружен максимум *HbFe*²⁺NO через 60 минут после операции, отражая его участие в ишемически-реперфузионных повреждениях [23]. Предполагается, что большая уязвимость зрелых внутриэритроцитарных форм возбудителя малярии частично может быть опосредована через NO, его производные и их вклад в иммуноэффекторную функцию организма [76].

ЭФФЕКТ ОКСИДА АЗОТА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНА

Уровень *SNO-Hb* в артериальной крови близок к 1 мкмоль. Эритроциты несут примерно в 1000 раз больше NO, чем это требуется для регуляции кровотока или дилатации кровеносных сосудов [26]. Если бы NO превращался при артериовенозном прохождении в соответствующие биоактивные эквиваленты, то возникла бы гипотензия, а NO-синтаза оказалась бы не способна поддерживать такие эндогенные количества *SNO-Hb*. Высвобождение нитрозотиолов в таком объеме (из гемоглобина) при каждом артериовенозном цикле несовместимо с жизнью, так как оно должно вызывать угрожающую для жизни гипотензию и шунтирование крови (регуляция кровотока требует лишь малых наномолярных количеств нитрозотиолов); также это создавало бы в организме непереносимую метаболическую нагрузку. В сигналах при артериовенозном прохождении для регуляции кровотока участвует лишь малая часть (0.1–1%) связанных с гемоглобином *SNO*-групп [45]. Возникает вопрос, почему присутствующие *in vivo* количества *SNO-Hb* и *HbFe*²⁺NO столь громадны, для чего они сохраняют свою связанную с NO активность. По мнению McMahon T.J. et al. [62], фундаментальным вопросом для понимания функции *SNO-Hb* является не то, как может высвободиться достаточное количество нитрозотиолов, чтобы расширять кровеносные сосуды, а то, как эритроциты могут запастись громадную часть NO, когда их гемоглобин регулярно контактирует с гипоксической тканью и внутриклеточным глутатионом из среды. Гемоглобин регулирует вытеснение NO, а так как кровоток регулируется наномолярными уровнями нитрозотиолов, его образование для расширения кровеносных сосудов и доставки O_2 намного важнее, чем связанное с ним изменение оксигенации крови, которое

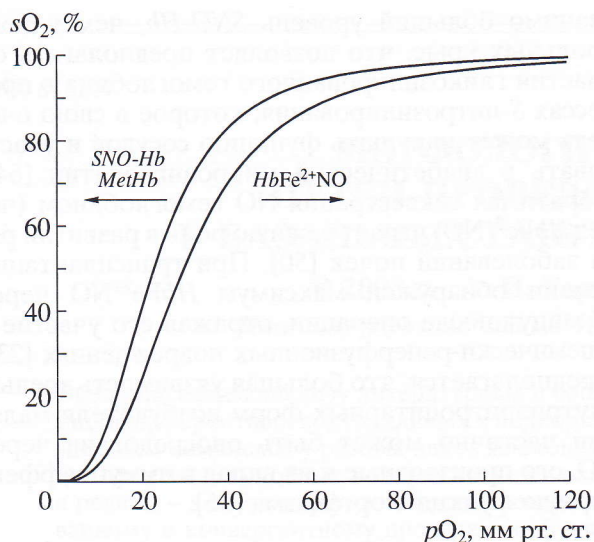


Рис. 2. Эффект NO-производных соединений на положение кривой диссоциации оксигемоглобина: *MetHb* – метгемоглобин, *SNO-Hb* – нитрозогемоглобин; *HbFe²⁺NO* – нитрозилгемоглобин.

может происходить лишь при его уровнях выше физиологических. На наш взгляд, значения NO-соединений с гемоглобином необходимо оценивать и через их эффект на СГК.

Присутствие различных соединений гемоглобина с NO может по-разному влиять на СГК всей крови. (рис. 2). NO может изменять СГК по следующим механизмам: переход гемоглобина из конформационного состояния *R* в *T*; повышение уровня эритроцитарного метгемоглобина; образование нитрозотиилов и дополнительных продуктов окисления гемоглобина [39]. Метгемоглобин и *SNO-Hb* повышают СГК, а *HbFe²⁺NO* его снижает, соответственно первые смещают кривую диссоциации оксигемоглобина влево, а последний – вправо (рис. 2). Величина *p50 SNO-Hb*, находящегося вне эритроцита, имеет значение менее 10 мм рт. ст. [24], для раствора *SNO-Hb* (с 30% нитрозилированием β⁹³-цистеина) составляет 4.3 ± 0.27 мм рт. ст. [65], а для *HbFe²⁺NO* его величина составляет 39.6 ± 1.5 мм рт. ст. [53]. Введение *L*-аргинина и ингибитора NO-синтазы (N^G-нитро-*L*-аргинин) при лихорадке, индуцированной введением ЛПС, сопровождалось увеличением *p50*_{станд} с 33.7 ± 1.1 до 37.1 ± 1.3 мм рт. ст., что в частности обусловлено различными эффектами NO-производных гемоглобина на СГК [5]. Высокие дозы нитроглицерина (источника NO) вызывают увеличение образования *HbFe²⁺NO*, коррелирующего с ростом значения *p50* и соответствующим сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [53]. В наших опытах у животных, получивших *L*-аргинин и подвергавшихся гипотермии, отмечается наименьший сдвиг кривой диссоциа-

ции оксигемоглобина влево [86]. Введение нитроглицерина в/б крысам приводило к увеличению метгемоглобина на 217.1% и *p50* на 29.2%, а в условиях введения липополисахарида и предварительного повышения СГК эти эффекты донора NO усиливались [9]. У больных серповидноклеточной анемией, дышавших воздухом с низким содержанием NO в течение 45 мин, а также при инкубации такой крови с NO в течение 5 мин отмечались близкие изменения СГК (*p50* уменьшалось примерно на 15%) у здоровых таких изменений не было, что, возможно, связано с малым объемом выборки [39] и предполагает единый механизм формирования кислородсвязывающих свойств крови с участием NO, реализуемый на эритроцитарном уровне. Обработка крови различными концентрациями NO, либо донорами NO (соль Анжели и другие) повышает СГК, линейно коррелирующее с уровнем метгемоглобина, что предполагает ведущую роль последнего в модификации транспорта кислорода кровью [40].

Гемоглобин, содержащий NO-группы, более устойчив к зависимому от O₂ переходу к *T*-структуре. *S*-нитрозилирование смягчает чрезмерное высвобождение NO, благоприятствуя *R*-структуре. При вдыхании воздуха, содержащего 80 промилей NO, уровень *HbFe²⁺NO* возрастал в 10 раз до микромолярной области, а *SNO-Hb* существенно не изменялся и не имел значимых артериовенозных градиентов [25]. Концентрация *SNO-Hb* и *HbFe²⁺NO* в крови такова, что на каждые из этих дериватов приходится 1000 тетрамеров обычного гемоглобина, и это делает относительно малым их влияние на кислородсвязывающие свойства крови при обычных условиях [45, 82], но при концентрациях NO выше физиологических условий (при низком *pH*, добавлении инозитолгексафосфата, низкой температуре) это вполне возможно. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови проявляется при высоких концентрациях (5 и более %), но в то же время их эффект может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляра [6, 86].

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В КРОВИ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Следует учитывать гетерогенность эндотелия по NO-образующей функции по ходу сосудистого русла. Иммуногистологические исследования указывают, что экспрессия эндотелиальной NO-синтазы снижается в различных отделах сосудистой системы с уменьшением диаметра, в артериях она наиболее высока, а в венах существенно меньше [18, 52]. При значимом атериевенозном градиенте наблюдаемая неоднородность распределения эндотелиальной NO-синтазы от-

ражает функциональные особенности каждого эндотелиального компонента. Так, базальный уровень синтеза NO в артериях выше, чем в венах. Содержание NO в артериальной крови у здоровых женщин, судя по величине $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, гораздо выше, чем в венозной (45.1 ± 17.7 в сравнении с 22.5 ± 8.5 мкмоль) [28]. Исследование содержания нитритов у добровольцев в плазме крови, взятой из локтевой артерии и антекубальной вены, характеризовалось наличием незначительного артериовенозного градиента, но существенно возраставшего в условиях стимуляции эндотелия ацетилхолином [56]. В исследовании на добровольцах показано, что содержание NO_2^- и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ в артериальной крови постоянно выше, чем в венозной [25]. Наличие артериовенозного градиента, например по $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, тем более удивительно, что время одного цикла движения для эритроцита составляет около 27 с, а на участке артерия – вена еще меньше, что означает наличие быстрого механизма высвобождения NO (намного быстрее, чем в опытах *in vitro* [37]). Вдыхание NO существенно повышает уровень нитрозилированного гемоглобина в крови и его артериовенозный градиент, для *SNO-Hb* такая закономерность не наблюдалась [35], что, по мнению этих исследователей, предполагает ведущую роль взаимодействия NO с гемом в его метаболизме кровью. Важно отметить, что в условиях ингибирования NO-синтазы наблюдалось выраженное снижение уровней NO_2^- (более 50%) характеризующееся сравнительно большим артериовенозным градиентом, отражая происхождение NO_2^- , измеряемого в венозных отделах, из сосудов предплечья [56]. Наличие данной разницы по *SNO-Hb*, по мнению Patel R.P. [66], связано с кислородзависимым механизмом его образования, т.е. зависит непосредственно от содержания O_2 в конкретном месте циркуляции крови. Артериовенозная разница содержания NO-производных есть, по-видимому, следствие различной NO-синтазной активности эндотелия по ходу сосудистой системы (его гетерогенности) и это значимо для SGK.

Конечно, на содержание конечных продуктов элиминации NO (нитритов/нитратов) в крови может оказывать влияние экспрессия других изоформ NO-синтазы (индуцибельной и нейрональной). Следует учитывать вклад NO, образуемого индуцибельной изоформой NO-синтазы, присутствующей во многих клетках, и в частности в эндотелиальных и гладкомышечных, так как образующие ими количества NO могут намного превышать их физиологические концентрации [16]. По мнению ряда авторов, индуцибельная изоформа NO-синтазы может приводить к образованию очень больших (микромолярных) количеств NO,

но прежде всего локально, в определенных регионах, а NO, синтезируемое нейрональной изоформой, не должна выделяться в значительном количестве в просвет сосуда [56].

Также важным в значимости эффекта NO на SGK является и особенность объемного содержания крови в различных отделах сердечно-сосудистой системы. На долю терминальных артериол и капилляров приходится 69% от общей площади сосудистой системы, а венул и вен – 30.5%, а объемы, содержащейся в них крови, составляют 10 и 75% соответственно [17], соответственно объемы крови, приходящиеся на единицу площади артериол и капилляров, будут наиболее высоки. Это предполагает более высокое содержание NO и его производных на микроциркуляторном участке сосудистого русла (в 100 и более раз) и соответственно его большую долю, взаимодействующую непосредственно с гемоглобином. На уровне микроциркуляции это может быть чрезвычайно важным для модифицирования его кислородсвязывающих свойств и в конечном итоге для оксигенации тканей. Важность связывания NO с гемами или тиолами гемоглобина состоит не только в непосредственном эффекте на функциональное поведение молекул, переносящих NO (т.е., S-нитрозилирование может служить для запасаения NO через благоприятствование R-структуре, тогда как переход на гем ограничивает его потерю NO при дезоксигенации), но и на популяцию гемоглобина в целом на данном участке сосудистой системы.

ОСНОВНЫЕ ПУТИ МОДИФИКАЦИИ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ

Долевой вклад NO в формирование кислородсвязывающих свойств, по мнению Gladwin M.T. et al. [34], невелик, но следует учитывать, что модуляция этих свойств есть результат многих факторов (*pH*, *pCO₂*, температура, 2,3-ДФГ и т.д.), и каждый из них имеет определенную роль. Внутриэритроцитарная система регуляции SGK, обладающая относительной автономией, обеспечивает адаптивные изменения кислородсвязывающих свойств крови. В этой системе функцию триггера аллостерической регуляции гликолиза и своеобразного аппарата сравнения соответствия метаболизма функциональному статусу выполняет 2,3-дифосфоглицерат [1], но, как показывают наши данные, также в этом может быть задействован и NO (рис. 3) [83, 84], что отмечают и другие авторы. Облучение мышей в малых дозах приводит к перераспределению соотношения между конформерами $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ в крови в сторону образования R-формы, что может иметь значение для изменения SGK [12]. Образование нитрозилированного гемоглобина, судя по ЭПР-спектру, может быть одним из механизмов действия нейролептиков (хлорпромазин) на SGK, а именно его

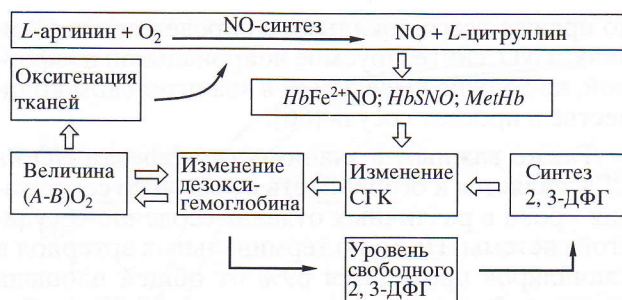


Рис. 3. Вклад NO-производных гемоглобина в внутри-эритроцитарную систему регуляции кислородсвязывающих свойств крови. $(A-B)O_2$ – артериовенозная разница по кислороду, СГК – сродство гемоглобина к кислороду, *MetHb* – метгемоглобин, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат.

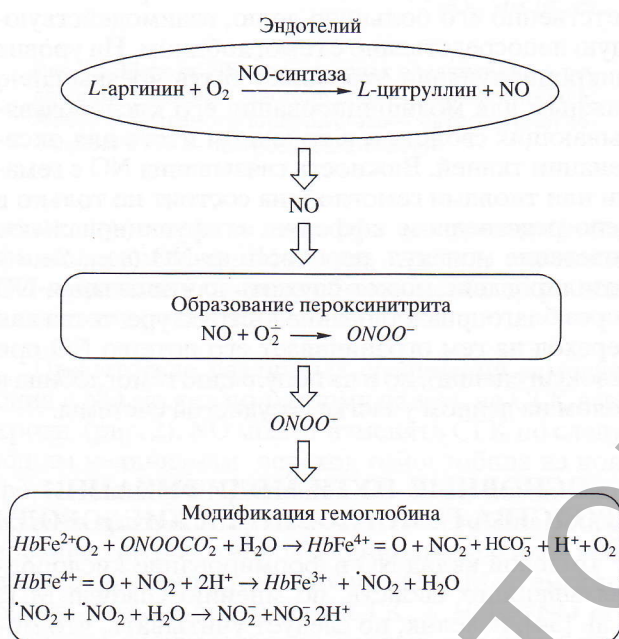


Рис. 4. Основные пути модификации гемоглобина пероксинитритом ($ONOO^-$).

снижения (через изменение конформационного равновесия от высокоаффинной формы лигандного тетрамера к низкоаффинной, что характерно и для физиологического модулятора СГК 2,3-дифосфоглицерата) [22].

Образование NO является кислородзависимым процессом. Кислород является одним из субстратов, необходимых для синтеза NO (константа Михаэлиса для него в этой реакции лежит в физиологической области), что позволяет предполагать его лимитирующую роль для образования NO [57]. При $pO_2 < 30$ мм рт.ст. ферментативный синтез NO снижается [54]. Показана тесная корреляция между уровнями NO и pO_2 в тканях мозга [44]. O_2 является важным фактором, определяю-

щим активность NO-синтазы в гипоксических тканях или в сосудистом русле, где в норме встречаются pO_2 в области 40 мм рт.ст.; активность NO-синтазы может ингибироваться гипоксией [81]. В гепатоцитах крыс выявлен механизм кислородной регуляции экспрессии гена индуцибельной изоформы NO-синтазы: низкое содержание O_2 индуцирует синтез NO, что может иметь значение для формирования резистентности этих клеток к ишемическому повреждению [78]. Концентрация $HbFe^{2+}NO$, судя по его ЭПР-спектроскопии в артериальной и смешанной венозной крови нормоксических и гипоксических овец при ингаляции NO, зависит от уровня O_2 и NO, существует выраженная отрицательная корреляция между уровнем $HbFe^{2+}NO$ и степенью насыщения крови [74]. Метаболический цикл NO может активироваться при различных гипоксических состояниях, так как в условиях дефицита O_2 восстановленные гемсодержащие белки переносят электроны на ионы NO_2^- , восстанавливая их до NO [15].

NO через эффект на СГК и регуляцию кровотока может влиять на процессы оксигенации тканей при различных гипоксиях. В то же время механизмы транспорта O_2 , и, в частности, кислородсвязывающие свойства крови могут определять активность L-аргинин-NO системы. Введение предшественника NO-L-аргинина может вызывать положительный эффект на более поздних стадиях гипотермии и сопровождаться менее выраженными нарушениями транспорта кислорода кровью, что, возможно, обусловлено его эффектом как на гемоглобин, так и на кровоток [4, 84]. Очевидно, эффект коррекции L-аргинин-NO-системы обусловлен как результатом прямого действия NO на гемоглобин, так и опосредовано через кислородзависимый механизм регуляции образования NO.

NO взаимодействует с O_2^- с образованием пероксинитрита (мощного окислителя) [71], который может быть модификатором свойств гемоглобина (рис. 4) через различные реакции [63]. $ONOO^-$ обуславливает: прямое окисление железа; нитрование остатков тирозина на молекуле гемоглобина [19]. Анализ спектров обработанного пероксинитритом гемоглобина в видимой области указывает, что в присутствии CO_2 оксигемоглобин окисляется до феррильной формы, что предполагает новый путь зависящего от пероксинитрита окисления гемоглобина, преобладающего в биологических системах содержащих CO_2 [63]. Также гемоглобин может обеспечивать защиту от пероксинитрита, выполняя функцию внутриклеточного антиоксиданта. Его способность связывать NO не только в результате образования комплексов с гемовым железом, но и путем образования комплексов с тиоловыми группами обес-

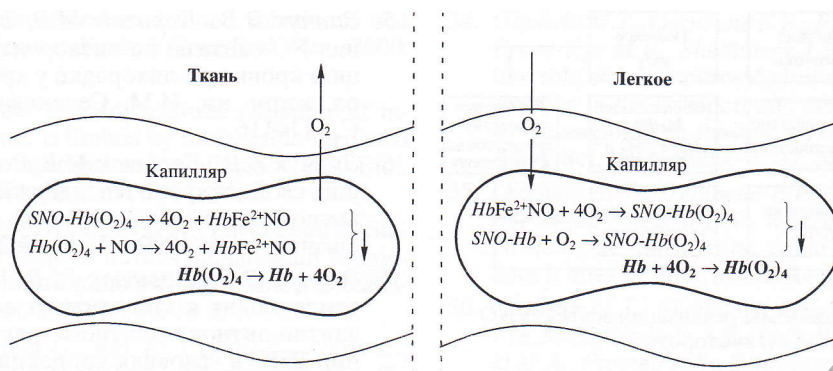


Рис. 5. Механизм влияния NO на процессы оксигенации и десатурации крови в капиллярах малого и большого кругов кровообращения.

печивает защиту клеток и субклеточных структур от избыточного образования NO. При этом уменьшается вероятность образования высоких концентраций пероксинитритов, а следовательно, и повреждающего действия высокореакционных продуктов, образующихся в результате распада пероксинитритов. В наших экспериментах у животных при гипотермии, получавших нитропруссид натрия или *L*-аргинин, выявлены различные изменения показателей кислородтранспортной функции крови [7, 8]. Возможно, это обусловлено тем, что при введении *L*-аргинина (естественного предшественника NO) происходит образование также *L*-цитруллина, который ресинтезируется и пополняет внутриклеточные запасы *L*-аргинина. Введение же нитропрусида натрия обуславливает неадекватное повышение количества NO с образованием пероксинитрита. Бóльшого усиления защитных эффектов при одновременной коррекции SGK и *L*-аргинин-NO системы не происходит, чем это было при их отдельном корригировании, что отражает, по-видимому, истощение адаптационных резервов антиоксидантного характера, реализуемых через кислородсвязывающие свойства гемоглобина, и свидетельствует об участии *L*-аргинин-NO системы и кислородтранспортной функции крови через близкие взаимосвязанные механизмы [9]. Все это может иметь важное значение в модификации функциональных свойств гемоглобина и его участии в формировании потока O_2 в ткани и поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме [85, 87]. Существует определенная связь между SGK и процессами его аутоокисления и окислительной модификации, гемоглобин выступает в роли редокс-активного соединения. Гемоглобин, регулируя содержание NO в том или ином регионе организма, формирует определенный уровень прооксидантно-антиоксидантного состояния. При нормальных физиологических условиях, когда количество образуемого NO невелико, прооксидантные эффекты $ONOO^-$ и H_2O_2 угнета-

ются антиоксидантной функцией NO; в условиях сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, чрезмерного образования O_2^- и соответственно $ONOO^-$ и H_2O_2 реализуется прооксидантный эффект NO [20]. SGK, регулируя уровень NO, может вносить вклад в равновесие между ним и O_2^- в сосудистой сети.

В ходе одного цикла движения эритроцита в сосудистой системе происходят последовательные реакции гемоглобина с NO, модулирующиеся его структурными переходами из *R*- в *T*-состояние. На уровне капилляров малого круга кровообращения это может быть дополнительным механизмом, способствующим оксигенации крови, а на уровне микроциркуляции большого круга – оптимизирующим десатурацию крови и соответственно доставку кислорода в ткани (рис. 5). В капиллярах легкого осуществляется зависимый от O_2 аллостерический переход гемоглобина ($T \rightarrow R$), обусловленный переносом NO-группы с гема на β^{93} -цистеин, соответственно в артериальное русло поступает молекула $SNO-Hb(O_2)_4$. В капиллярах большого круга кровообращения осуществляется обратный переход ($R \rightarrow T$) с высвобождением NO и инициирования им сосудистой дилатации, либо высвобождением O_2 , последующей оксигенации тканей и образованием $HbFe^{2+}NO$, который может влиять и на SGK. Кислородсвязывающие свойства крови влияют на состояние *L*-аргинин-NO системы, и в то же время она может определять функциональные свойства гемоглобина путем модификации его сродства к кислороду через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислородзависимый характер образования NO, регуляцию сосудистого тонуса, действие пероксинитрита (рис. 6). Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови может иметь важное значение для процессов газообмена за счет гетерогенности эндотелия по NO-образующей функции и особенностей объемного содержания крови в

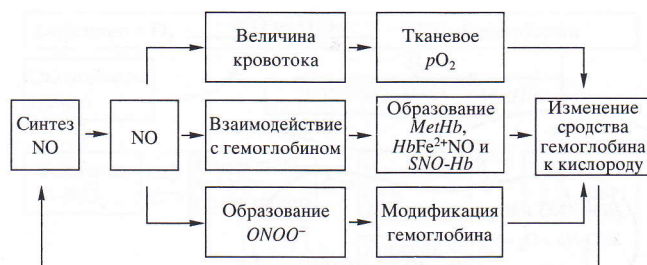


Рис. 6. Основные механизмы реализации эффекта NO на сродство гемоглобина к кислороду.

различных отделах сердечно-сосудистой системы (в терминальных артериолах и капиллярах).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюция наших представлений о взаимодействии NO с гемоглобином прошла сложный путь: от понимания роли гемоглобина только как фактора элиминации NO до его значения как депо и далее как модификатора кислородсвязывающих свойств гемоглобина. Очевидно, данные изменения SGK наиболее благоприятны для адекватной оксигенации тканей. Анализ литературы и результаты выполненных нами исследований свидетельствуют о том, что *L*-аргинин-NO система может участвовать в формировании кислород-транспортной функции крови при окислительном стрессе и гипоксии. NO может определять SGK и соответственно процессы оксигенации и деоксигенации в капиллярной сети малого и большого кругов кровообращения, а также другие функции крови.

Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ (№ Б99-055).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисюк М.В. Особенности регуляции кислород-связывающих свойств крови в процессе ее циркуляции // Успехи физиол. наук. 1984. Т. 15. № 2. С. 3–26.
2. Ванин А.Ф. Оксид азота: регуляция клеточного метаболизма без участия регуляторы клеточных рецепторов // Биофизика. 2001. Т. 46. № 4. С. 631–641.
3. Галаган М.Е., Киладзе С.В., Ванин А.Ф. Реакция динитрозильных комплексов негемового железа с диэтилдитиокарбаматом в крови анестезированных крыс: ее специфическое проявление на физико-химическом и физиологическом уровнях // Биофизика. 1997. Т. 42. № 3. С. 687–693.
4. Дорохина Л.В., Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное равновесие у крыс при гипотермии в условиях коррекции *L*-аргинин-NO системы // Вестн АН РБ/сер. биол. нав. 2000. № 4. С. 83–86.
5. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Эффект ингибирования NO-синтазы на кислородтранспортную функцию крови при лихорадке у кроликов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1997. Т. 83. № 4. С. 111–116.
6. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма // Успехи физиол. наук. 1999а. Т. 30. № 3. С. 38–48.
7. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Изменение сродства гемоглобина к кислороду и параметров прооксидантно-антиоксидантного равновесия при введении ЛПС в условиях коррекции *L*-аргинин-NO-пути // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1999б. Т. 127. № 6. С. 616–619.
8. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. 2001а. Т. 30. № 3. С. 68–78.
9. Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при введении липополисахарида в условиях коррекции сродства гемоглобина к кислороду и *L*-аргинин-NO-системы // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001б. Т. 131. № 1. С. 39–42.
10. Мальцев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 992–1006.
11. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. 2000. Т. 65. № 4. С. 485–503.
12. Миль Е.М., Каспаров В.В., Бинюков В.И., Табачникова Н.В., Борисова О.А. Изменение спектров ЭПР нитрозильных комплексов гемопротеинов крови при низкоинтенсивном тотальном облучении мышей // Радиацион. биол. и радиоэкол. 2000. Т. 40. № 3. С. 305–309.
13. Петренко Ю.М., Шашурин Д.А., Титов В.Ю. Новые источники оксида азота, их возможная физиологическая роль и значение // Эксперим. клин. фармакол. 2001. Т. 64. № 2. С. 72–80.
14. Реутов В.П., Ажипа Я.И., Каюшин Л.П. Изучение методом электронного парамагнитного резонанса продуктов взаимодействия оксидов азота с некоторыми органическими соединениями. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1978. № 9. С. 299–301.
15. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. С. 156.
16. Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клецев А. Гиперпродукция азота в патофизиологии кровеносных сосудов // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 976–983.
17. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. М.: Мир, 1996. Т. 2. С. 507–509.
18. Addicks K, Bloch W, Feelisch M. Nitric oxide modulates sympathetic neurotransmission at the prejunctional level // Microsc. Res. Tech. 1994. V. 29. № 2. P. 161–168.
19. Alayash A.I., Ryan B.A.B., Cashon R.E. Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 349. № 1. P. 65–73.

20. Alayash A.I. Hemoglobin-based blood substitutes and the hazards of blood radicals // *Free Rad. Res.* 2000. V. 33. P. 341–348.
21. Albakri Q.A., Stuehr D.J. Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 10. P. 5414–5421.
22. Ascenzi P., Bertollini A., Coletta M., Lucacchini A. Stabilization of the T-state of ferrous human adult haemoglobin by chlorpromazine and trifluoperazine // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. V. 30. № 2. P. 185–187.
23. Battista S., Mengozzi G., Bar F., Cerutti E., Pollet C., Torchio M., Biasi F., Cavalli G., Salizzoni M., Poli G., Molino G. Nitric oxide level profile in human liver transplantation // *Dig. Dis. Sci.* 2002. № 3. P. 528–534.
24. Bonaventura C., Ferruzzi G., Tesh S., Stevens R.D. Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 35. P. 24742–2478.
25. Cannon R.O., Schechter A.N., Panza J.A., Ognibene F.P., Pease-Fye M.E., Waclawiw M.A., Shelhamer J.H., Gladwin M.T. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. № 2. P. 279–287.
26. Carter T.D., Bettache N., Ogden D. Potency and kinetics of nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation determined with flash photolysis of ruthenium nitrosyl chlorides // *Br. J. Pharmacol.* 1997. V. 122. P. 971–973.
27. Chen L.Y., Mehta J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998. V. 32. P. 57–61.
28. Cicinelli E., Ignarro L.J., Schonauer L.M., Matteo M.G., Galantino P., Falco N. Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood // *Clin. Physiol.* 1999. V. 19. № 5. P. 440–442.
29. Coletta M., Angeletti P., Ascenzi A., Bertollini S., Della Longa G. Heterotropic effectors exert more significant strain on monoligated than unligated hemoglobin // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 1532–1536.
30. Deem S., Gladwin M.T., Berg J.T., Kerr M.E., Swenson E.R. Effects of S-nitrosation of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction and nitric oxide flux // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2001. V. 163. № 5. P. 1164–1170.
31. Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J.C., Salemes N., Gogas J. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients // *Anticancer. Res.* 1995. V. 15. P. 1435–1446.
32. Eaton W., Henry E.R., Hofrichter J., Mozzarelli A. Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. P. 353–358.
33. Ewing J.F., Janero D.R. Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium(III) reduction and ozone-chemiluminescent detection // *Free. Radic. Biol. Med.* 1998. V. 25. № 4–5. P. 621–628.
34. Gladwin M.T., Ognibene F.P., Pannell L.K., Nichols J.S., Pease-Fye M.E., Shelhamer J.H., Schechter A.N. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 18. P. 9943–9948.
35. Gladwin M.T., Ognibene F.P., Shelhamer J.H., Pease-Fye M.E., Noguchi C.T., Rodgers G.P., Schechter A.N. Nitric oxide transport on sickle cell hemoglobin: where does it bind? // *Free. Radic. Res.* 2001. № 2. P. 175–180.
36. Gladwin M.T., Shelhamer J.H., Ognibene F.P., Pease-Fye M.E., Nichols J.S., Link B., Patel D.B., Jankowski M.A., Pannell L.K., Schechter A.N., Rodgers G.P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease // *Br. J. Haematol.* 2002. V. 6. № 2. P. 436–444.
37. Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 16. P. 9027–9032.
38. Gross S.S., Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 18. P. 9967–9969.
39. Head C.A., Brugnara C., Martinez-Ruiz R., Kacmarek R.M., Bridges K.R., Kuter D., Bloch K.D., Zapol W.M. Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. № 5. P. 1193–1198.
40. Hrinchenko B.W., Alayash A.I., Wink D.A., Gladwin M.T., Rodgers G.P., Schechter A.N. Effect of nitric oxide and nitric oxide donors on red blood cell oxygen transport // *Br. J. Haematol.* 2000. V. 110. P. 412–419.
41. Hsia C.C.W. Mechanisms of disease: Respiratory function of hemoglobin // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 338. № 4. P. 239–247.
42. Huang K.T., Han T.H., Hyduke D.R., Vaughn M.W., Herle H.V., Hein T.W., Zhang C., Liao J.C. Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 20. P. 11771–11776.
43. Huang J., Hadimani S.B., Rupon J.W., Ballas S.K., Kim-Shapiro D.B., King S.B. Iron nitrosyl hemoglobin formation from the reactions of hemoglobin and hydroxyurea // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 7. P. 2466–2474.
44. James P.E., Miyake M., Swartz H.M. Simultaneous measurement of NO and pO₂ from tissue by in vivo EPR // *Nitric Oxide.* 1999. V. 3. № 4. P. 292–301.
45. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control // *Nature.* 1996. V. 380. P. 221–226.
46. Jourdain D., Hallen K., Feelisch M., Grisham M.B. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood // *Free. Radic. Biol. Med.* 2000a. V. 28. № 3. P. 409–417.
47. Jourdain D., Gray L., Grisham M.B. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000b. V. 273. № 1. P. 22–26.
48. Jubelin B.C., Gierman J.L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide // *Am. J. Hypertens.* 1996. V. 9. P. 1214–1219.

49. Kang E.S., Ford K., Grokulsky G., Wang Yu-Bo., Chiang T.M., Acchiardo S.R. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins // *J. Lab. Clin. Med.* 2000. V. 135. № 6. P. 444–451.
50. Kang E.S., Miles D.E., Tevlin M.T., Cates T.B., Acchiardo S.R. Reversible sequestration of nitric oxide by hemoglobin during hemodialysis in end-stage renal disease // *Am. J. Med. Sci.* 2001. V. 321. № 2. P. 113–123.
51. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown // *Biochem. Biophys. Acta.* 1999. № 1411. P. 273–289.
52. Kelm V., Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO pathway // *Basic. Res. Cardiol.* 2001. V. 96. P. 107–127.
53. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 218. № 3. P. 749–752.
54. Kourembanas S., Marsden P.A., McQuillan L.P., Faller D.V. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 88. № 3. P. 1054–1057.
55. Kozlov A.V., Sobhian B., Costantino G., Nohl H., Redl H., Bahrami S. Experimental evidence suggesting that nitric oxide diffuses from tissue into blood but not from blood into tissue // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1536. № 2, 3. P. 177–184.
56. Lauer T., Preik M., Rassaf T., Strauer B.E., Deussen A., Feelisch M., Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 22. P. 12814–12819.
57. LeCras T.D., McMurtry I.F. Nitric oxide production in the hypoxic lung // *Am. J. Physiol.* 2001. V. 280. № 4. P. L575–L582.
58. Liu X., Miller M.J., Joshi M.S., Sadowska-Krowicka H., Clark D.A., Lancaster J.R. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 30. P. 18709–18713.
59. Malinski T., Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor // *Nature.* 1992. V. 358. P. 676–677.
60. Mamone G., Sannolo N., Malorni A., Ferranti P. In vitro formation of S-nitrosohemoglobin in red cells by inducible nitric oxide synthase // *FEBS. Lett.* 1999. V. 462. № 3. P. 241–245.
61. May J.M., Qu Z.-C., Xia L., Cobb C.E. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes // *Am. J. Physiol. Cell.* 2000. V. 279. P. C1946–C1954.
62. McMahon T.J., Stone A.E., Bonaventura J., Singel D.J., Stamler J.S. Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 22. P. 16738–16745.
63. Minetti M., Scorza G., Pietraforte D. Peroxynitrite induces long-lived tyrosyl radical(s) in oxyhemoglobin of red blood cells through a reaction involving CO₂ and a ferryl species // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 2078–2087.
64. Padron J., Peiro C., Cercas E., Llergo J.L., Sanchez Ferrer C.F. Enhancement of S-nitrosylation in glycosylated hemoglobin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 271. № 1. P. 217–221.
65. Patel R.P., Hogg N., Spencer N.Y., Kalyanaraman B., Matalon S., Darley-Usmar V.M. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin effects on oxygen binding and transnitrosation // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 22. P. 15487–15492.
66. Patel R.P. Biochemical aspects of the reaction of hemoglobin and NO: Implications for Hb-based blood substitutes // *Free. Radical. Biology. and Medicine.* 2000. V. 28. № 10. P. 1518–1525.
67. Pawloski J.R., Hess D.T., Stamler J.S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity // *Nature.* 2001. V. 409. P. 622–626.
68. Perutz M.F. Blood. Taking the pressure off // *Nature.* 1996. V. 380. № 6571. P. 205–206.
69. Sakinis A., Jungersten L., Wennmalm A. An 18oxygen inhalation method for determination of total body formation of nitric oxide in humans // *Clin. Physiol.* 1999. V. 19. № 6. P. 504–509.
70. Samaja M. Blood gas transport at high altitude // *Respiration.* 1997. V. 64. P. 422–428.
71. Squadrito G.L., Pryor W.A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide // *Chem. Biol. Interact.* 1995. V. 96. P. 203–206.
72. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient // *Science.* 1997. V. 276. P. 2034–2037.
73. Stepuro I., Chaikovskaya N., Piletskaya T., Solodunov A. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin // *Pol. J. Pharmacol.* 1994. V. 46. P. 601–607.
74. Takahashi Y., Kobayashi H., Tanaka N., Sato T., Takizawa N., Tomita T. Nitrosyl hemoglobin in blood of normoxic and hypoxic sheep during nitric oxide inhalation // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 43. P. H349–H357.
75. Tannenbaum S. Nitrate and nitrite: origin in humans // *Science.* 1994. № 205. P. 1333–1335.
76. TaylorRobinson A.W. The sequestration hypothesis: an explanation for the sensitivity of malaria parasites to nitric oxide-mediated immune effector function in vivo // *Med. Hypoth.* 2000. V. 54. № 4. P. 638–641.
77. Vallance P., Patton S., Bhagat K., MfcAllister R., Radoski M., Moncada S., Malinski T. Direct measurement of nitric oxide in human beings // *Lancet.* 1995. № 345. P. 153–154.
78. Vargiu C., Belliardo S., Cravanzola C., Grillo M.A., Colomatto S. Oxygen regulation of rat hepatocyte iNOS gene expression // *J. Hepatol.* 2000. V. 32. № 4. P. 567–573.
79. Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L., Liao J.C. Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis // *Nitric Oxide.* 2001. V. 5. № 1. P. 18–31.
80. Wennmalm A., Benthin G., Edlund A., Jungersten L., Kieler-Jensen N., Lundin S., Westfelt U.N., Petersson A.S., Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans // *Circ. Res.* 1993. V. 73. P. 1121–1127.
81. Whorton A.R., Simonds D.B., Piantadosi C.A. Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular en-

- dothelial cells // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 16. P. L1161–1166.
82. Yonetani T., Tsuneshige A., Zhou Y., Chen X. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-Nitrosyl hemoglobin. A novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 20323–20333.
83. Zinchuk V., Borisiuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // *Respir. Physiol.* 1998. V. 113. № 1. P. 39–45.
84. Zinchuk V.V. High hemoglobin affinity to oxygen and its relationships with lipid peroxidation during fever // *J. Physiol. Biochem.* 1999a. V. 55. № 4. P. 301–308.
85. Zinchuk V. Effect of NO-synthase inhibition on hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation in rabbits during fever // *Respiration.* 1999b. V. 66. № 5. P. 448–454.
86. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway // *Nitric Oxide.* 2002. V. 6. № 1. P. 29–34.
87. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., Maltsev A.N. Prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia combined with modified hemoglobin-oxygen affinity // *J. Therm. Biol.* 2002. V. 27. № 5. P. 345–352.

Поступила в редакцию
1.02.2002 г.

The Involvement of Nitric Oxide in Formation of Hemoglobin Oxygen-Binding Properties

V. V. Zinchuk

Grodno Medical University, Belarus

The analysis of literature and results of our investigations indicate the possible involvement of L-arginine-nitric oxide (NO) system in formation of blood oxygen-carrying capacity. In reaction with hemoglobin NO forms methemoglobin, nitrosyl-hemoglobin ($HbFe^{2+}NO$) and S-nitrosohemoglobin (*SNO-Hb*). The NO-hemoglobin derivatives have the various biological functions (NO transport, storage, elimination etc.) and are involved in the genesis of different pathologic conditions. The presence of different NO-hemoglobin derivatives can differently influence on the whole blood hemoglobin-oxygen affinity (*HOA*): methemoglobin and *SNO-Hb* increases, and $HbFe^{2+}NO$ decreases it. Their effect on the blood oxygen-binding properties may be important for the gas exchange processes. At the level of lung capillaries such effect may be the additional mechanism promoting a blood oxygenation, and in the systemic microcirculation it may optimize blood desaturation and hence the tissue oxygen delivery. Blood oxygen-binding properties affect the state of L-arginine-NO system, however this system also may determine *HOA* through the intraerythrocytic regulatory mechanisms, oxygen-dependent nature of NO generation, regulation of vascular tone and effect of peroxynitrite.